

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61K 38/06, 38/07, 38/08, 47/48</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/02177</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>21. Januar 1999 (21.01.99)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/CH98/00300</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AT (Gebrauchsmuster), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, CZ (Gebrauchsmuster), DE, DE (Gebrauchsmuster), DK, DK (Gebrauchsmuster), EE, EE (Gebrauchsmuster), ES, FI, FI (Gebrauchsmuster), GB, GE, GH, GM, GW, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (Gebrauchsmuster), SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>7. Juli 1998 (07.07.98)</b>			
(30) Prioritätsdaten: <b>1651/97 7. Juli 1997 (07.07.97) CH</b>			
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): PEPTI-CHEMIO AG [CH/CH]; c/o Notariat Daniel Barbier, Spitalgasse 29, CH-3011 Bern (CH).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): MEHLEM, Francesco [IT/CH]; Lindenhofstrasse 2, CH-3048 Worblaufen (CH).			
(74) Anwalt: BOVARD AG; Optingenstrasse 16, CH-3000 Bern 25- (CH).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING PEPTICHEMIO

(54) Bezeichnung: PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ENTHALTEND PEPTICHEMIO

## (57) Abstract

The invention relates to pharmaceutical preparations for treating cancers, especially melanomas. The inventive composition contains at least one peptide compound, said peptide compound containing L-m-sarcolysine as the amino acid building block and being selected from the following group: L-seryl-L-p-fluorophenylalanyl-L-m-sarcolysine, L-propyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanine, L-m-sarcolysyl-N-nitro-L-arginyl-L-norvaline, L-p-fluorophenylalanyl-L-m-sarcolysyl-L-asparagine, L-p-fluorophenylalanyl-glycyl-L-m-sarcolysyl-norvaline, L-m-sarcolysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-m-sarcolysyl-L-histidine and low alkyl esters and/or acid addition salts thereof as active constituents. The composition contains an optionally substituted cyclodextrin as an auxiliary or a support agent. A composition containing PSF as the active agent and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as the support agent is particularly effective. The compositions which are the subject of the parent application contain hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin whilst the preparations produced for oral administration in the form of capsules contain  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  cyclodextrin.

## (57) Zusammenfassung

Es werden pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung gestellt, welche zur Behandlung von Krebsleiden, insbesondere von Melanomen, dienen. Als aktive Komponente enthält die Zusammensetzung mindestens eine Peptidverbindung, die L-m-Sarcolysin als Aminosäurebaustein enthält und die aus der nachstehenden Gruppe ausgewählt ist: L-Seryl-L-p-fluorophenylalanyl-L-m-sarcolysin, L-Propyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin, L-m-Sarcolysyl-N-nitro-L-arginyl-L-norvalin, L-p-Fluorophenylalanyl-L-m-sarcolysyl-L-asparagin, L-p-Fluorophenylalanyl-glycyl-L-m-sarcolysyl-norvalin, L-m-Sarcolysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-m-sarcolysyl-L-histidin und Niederalkylester und/oder Säureadditionssalze davon. Als Hilfs- oder Trägersubstanz enthält die Zusammensetzung mindestens ein gegebenenfalls substituiertes Cyclodextrin. Eine besonders gute Aktivität besitzt eine Zusammensetzung, welche als Wirkstoff PSF und als Trägerstoff Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin enthält. Die für die parenterale Applikation bestimmten Zusammensetzungen enthalten Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, während die für die orale Verabreichung als Kapseln konfektionierten Mittel  $\alpha$ - $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrin enthalten.

#### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

## PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ENTHALTEND PEPTICHEMIO

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, in welcher pharmazeutisch aktive Peptide, die L-m-Sarcolysin als Aminosäurebaustein enthalten, formuliert sind. Die Wirkstoffe dienen insbesondere zur Chemotherapie gegen Krebsleiden und werden speziell gegen Melanome eingesetzt. Eine Trägersubstanz auf Basis von Cyclodextrin dient einer verzögerten Freisetzung der Wirkstoffe und ist für eine genügende Bioverfügbarkeit während einer ausreichend langen Zeitdauer verantwortlich.

Ein Komplex von sechs Peptiden, die m-L-Sarcolysin enthalten, ist unter dem Warennamen „Peptichemio“ (Istituto Sieroterapico Milanese S. Belfanti, Milano, IT) für die Chemotherapie gegen Krebs bekannt geworden. Es wurde gefunden, dass die Aktivität der einzelnen Peptide verschieden ist und dass besonders ein Vertreter eine sehr hohe Toxizität für Melanomzellen aufweist. Die Peptide sind eine Entwicklung, welche mit dem Produkt „Melphalan“, d.h. 4-[bis(2-Chlorethyl)]-amino-L-phenylalanin begonnen hat. Es wurde gefunden, dass dieses Produkt eine zytostatische Wirkung hat und sowohl für die Myelom- als auch für die Melanomtherapie eingesetzt werden kann. Zur Weiterentwicklung des Wirkstoffes wurden Derivate des Produktes hergestellt. Daraus resultierte auch das L-m-Sarcolysin, das weiter deriviert wurde, indem Peptide hergestellt wurden, welche die modifizierte Aminosäure als Baustein enthielten. Eine Kombination von 6 derartigen Oligopeptiden bildete das aktive Prinzip der Antitumormittel „Peptichemio“. Die 6 Peptide sind folgende:

- 25            – L-Seryl-L-p-fluorphenylalanyl-L-m-sarcolysyl-ethylester
- L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester
- L-m-Sarcolysyl-N-nitro-L-arginyl-L-norvalin-ethylester
- L-p-Fluorphenylalanyl-L-m-sarcolysil-L-asparagin-ethylester
- L-p-Fluorphenylalanyl-glycyl-L-m-sarcolysyl-norvalin-ethylester
- 30            – L-m-Sarcolysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-m-sarcolysyl-L-histidin-methylester

Es wurde gefunden, dass Peptichemio weniger toxisch gegen humane Lymphoplasten ist als m-L-Sarcolysin allein. Zusätzlich zur kleineren Toxizität von Peptichemio wurde eine verminderte Bildung von DNA-Vernetzungen festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte Zytotoxizität von Peptichemio gegen humane Melanomzelllinien festgestellt, im Vergleich zum m-L-Sarcolysin. Hier war die höhere Zytotoxizität mit einer grösseren DNA-Vernetzung verbunden. Die Vergleichsanalyse der 6 Peptide zeigte Unterschiede in der Zytotoxizität gegen Melanomzellen. Eines der 6 Peptide zeigte eine beträchtlich höhere Zytotoxizität im Vergleich zum Peptichemio selbst (R. Levenson, et al., Radiumhemmet, Karolinska Hospital, Stockholm SE, Eur. J. Cancer Clin. Oncol.; 23: 6, 783-788, 1987). Gemäss diesen Studien wurde gefunden, dass das Peptid L-Propyl-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin (PSF) 35 x bzw. 28 x toxischer gegen RPMI 8322 Melanomzellen war als Melphalan bzw. m-Sarcolysin. Ähnliche Unterschiede zwischen den Wirkstoffen wurden auch für andere Melanomzelllinien gefunden.

Damit die in vitro gefundene Aktivität ebenfalls in vivo entfaltet werden kann, muss die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes im Körper ausreichend sein. Es muss eine genügend hohe Konzentration während einer genügenden Zeitdauer vorhanden sein bzw. die Halbwertszeit des aktiven Prinzipes muss genügend sein.

Es ist demzufolge Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, durch welche eines oder mehrere der 6 Peptide in solcher Weise verabreicht werden können, damit die Bioverfügbarkeit den gestellten Anforderungen genügt.

Es wurde gefunden, dass eine Kombination eines oder mehrerer der 6 Peptide mit einer substituierten Cyclodextrin-Verbindung als Träger diese Anforderungen erfüllt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demzufolge die im Patentanspruch 1 definierte pharmazeutische Zusammensetzung. Als Wirkstoff enthält die Zusammensetzung mindestens eines der Peptide, ausgewählt aus der Gruppe:

- L-Seryl-L-p-fluorphenylalanyl-L-m-sarcolysin
- L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin
- L-m-Sarcolysyl-N-nitro-L-arginyl-L-norvalin
- L-p-Fluorphenylalanyl-L-m-sarcolysil-L-asparagin
- 5 – L-p-Fluorphenylalanyl-glycyl-L-m-sarcolysyl-norvalin
- L-m-Sarcolysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-m-sarcolysyl-L-histidin

und ihre Niederalkylester, insbesondere ihre Ethyl- und Methylester und/oder Säureadditionssalze davon.

Die Peptide liegen vorzugsweise in Form von Hydrochloriden oder Hydrobromiden vor. Vorzugsweise wird L-Proyl-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin (PSF) verwendet. Der Cyclodextrinträgerstoff, welcher der Regulierung der Bioverfügbarkeit dient, ist vorzugsweise Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. Dieses Produkt ist im Handel erhältlich und wurde beschrieben von Pitha et al. in „Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin preparation and characterization“, International Journal of Pharmaceutics, 29: 73 bis 83 (1986). Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin ist unter dem Warennamen „Incapsin“ der Firma Janssen im Handel erhältlich.  $\beta$ -Cyclodextrin wird nur für den oralen und topischen Bereich verwendet. Zur parenteralen Verabreichung wird ein substituiertes  $\beta$ -Cyclodextrin, vorzugsweise Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin verwendet. Die Cyclodextrinverbindung bildet mit den Peptiden einen Komplex und bewirkt bei parenteraler Applikation, dass der Wirkstoff im Organismus in genügender Konzentration zur Verfügung gestellt wird. Vorzugsweise wird als Wirkstoff PSF zusammen mit Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin verwendet, wobei ein Mol-Verhältnis PSF zu Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin im Bereich von 1:1 bis 1:10 verwendet wird. Typische Beispiele derartiger Verhältnisse sind 1:1, 1:2, 1:3. Der Wirkstoff bildet mit der Cyclodextrinverbindung einen Komplex, in welchem das Peptid stabilisiert wird. Die Halbwertszeiten in der Größenordnung von 10 bis 30 min. des Wirkstoffes in einer Körperflüssigkeit

werden durch Inklusion in einen Komplex mit Cyclodextrin erhöht, wobei eine Steuerung durch das obenerwähnte Verhältnis möglich ist. Der Komplex kann durch den Organismus besser aufgenommen und absorbiert werden, wobei die Bioverfügbarkeit positiv beeinflusst wird. Das Verhältnis muss der Krankheit 5 des Patienten und seinem Gesundheitszustand angepasst werden. Das Produkt kann als festes Produkt oder als Konzentrat vorgelegt werden, welches zur Herstellung von injizierbaren Lösungen oder Infusionen dient. Falls therapeutisch erforderlich, kann die pharmazeutische Formulierung auch andere Wirkstoffe enthalten.

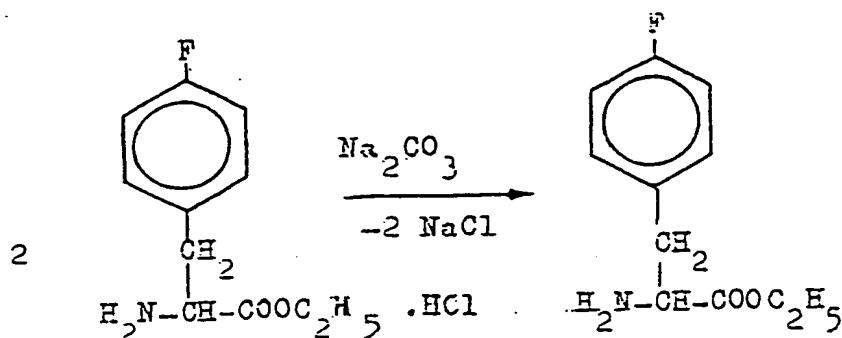
10 Für orale Formulierungen wird das PSF mit  $\alpha$ -, oder  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrin vermischt. Das Verhältnis von Peptid zu Cyclodextrin beträgt hier beispielsweise 1 : 1 bis 1 : 10, typischerweise 1:1, 1:2, 1:3. Die Kombination wird gegebenenfalls zusammen mit einem geeigneten Trägerstoff in Kapseln verpackt.

15 Herstellungsbeispiel (Wirkstoff):

Synthese von L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester-hydrochlorid

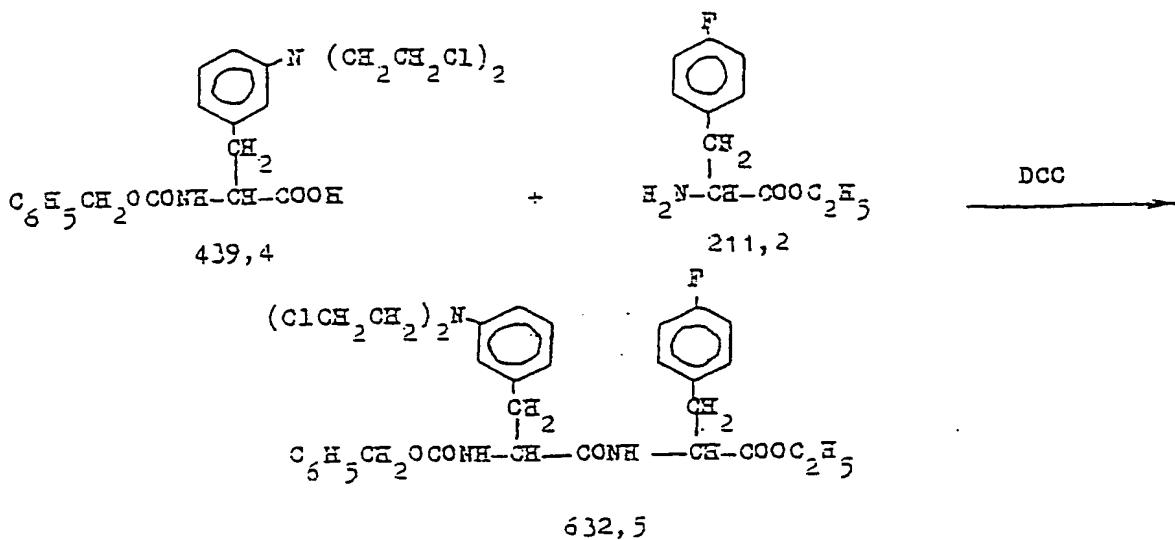
a) N-Carbobenzoxy-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester

52,5 g L-p-Fluorphenylalaninethylester Hydrochlorid werden mit 75 20 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Natriumcarbonat) gesättigte Lösung und 150 ml CHCl<sub>3</sub> behandelt. Die Mischung wird ausgeschüttelt und die organische Phase wird getrennt und aufbewahrt. Die wässrige Phase wird mit 75 ml CHCl<sub>3</sub> ein zweites Mal ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformextrakte werden gemischt und einmal mit Wasser gewaschen, und dann von der wässrigen Phase getrennt 25 und auf wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Die Konzentration von Aminosäureester wird durch eine Titration mit HClO<sub>4</sub> (Perchlorsäure) bestimmt. Die Ausbeute entspricht ungefähr dem theoretischen Wert; sie liegt bei 98%.



286,5 ml einer Chloroformlösung, die 0,1905 Mol L-p-Fluorphenylalaninethylester enthält, werden mit 83,7 g (0,1905 Mole) N-Cbzo-L-m-sarcolysin versetzt. Die Lösung wird auf einem Eisbad gekühlt.

5 Der gekühlten Lösung werden unter Rühren 41,25 g (0,200 Mol Dicyclohexylcarbodiimid - DCC) und 60 ml Chloroform dazugegeben, wobei die Lösung während 30 min. unter gleichzeitiger Kühlung ständig gerührt wird. Unter Umständen kann die Mischung zu fester Masse erstarren. In diesem Fall wird die Masse durch Zugabe von 150 ml Chloroform wieder flüssig gemacht, 10 wobei sie unter leichtem Erwärmen gerührt wird. Auf diese Weise wird die Auflösung des ausgefallenen Produktes beschleunigt. Die Reaktion ist 2 h nach Zugabe des DDC beendet. Das Reaktionsende wird durch TLC-Kontrolle festgestellt (Dünnschichtchromatographie; Kielgel G-Schicht, Lösungsmittel: Chloroform + Aceton 9:1, Sichtbarmachung durch Besprühen mit verdünnter, 15 saurer  $\text{KMnO}_4$ -Lösung). Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird durch Filtration abgetrennt. Die Lösung wird zuerst mit wenig Wasser, dann mit gesättigter  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung gewaschen. Die Chloroformlösung wird noch einmal mit Wasser ausgeschüttelt und dann mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum verdampft und entfernt. Nach Trocknung 20 werden 140,25 g leicht gelblich gefärbtes Produkt erhalten (Ausbeute 98,3%). Die gewonnene Substanz hat einen Schmelzpunkt von 123-124,5°C und ist chromatographisch homogen. Durch Kristallisation von 4,5 g Substanz aus 37,5 ml Ethylalkohol werden 3,75 g helleres Produkt gewonnen mit einem Schmelzpunkt von 125-126 °C.  $\alpha_D^{20}$ : 27.7 (c = 2,  $\text{CHCl}_3$ ).



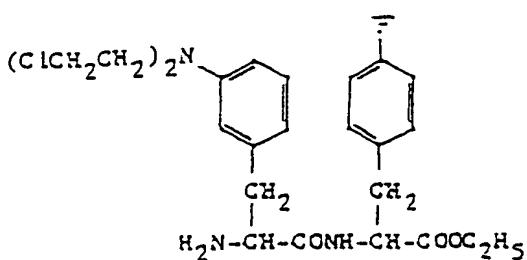
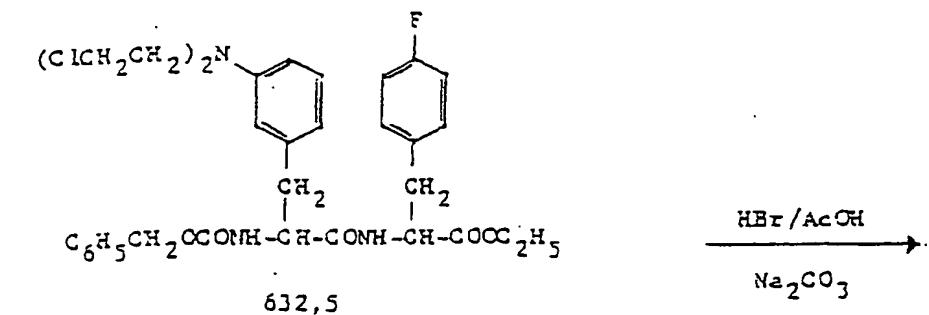
Analyse für  $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{FN}_3\text{O}_5$

N% = 6,67 (berechnet 6,66)

Cl% = 11,5 (berechnet = 11,2)

5

b) L-m-Sarcolysyl-L-p-fluorophenylálanin-ethylester



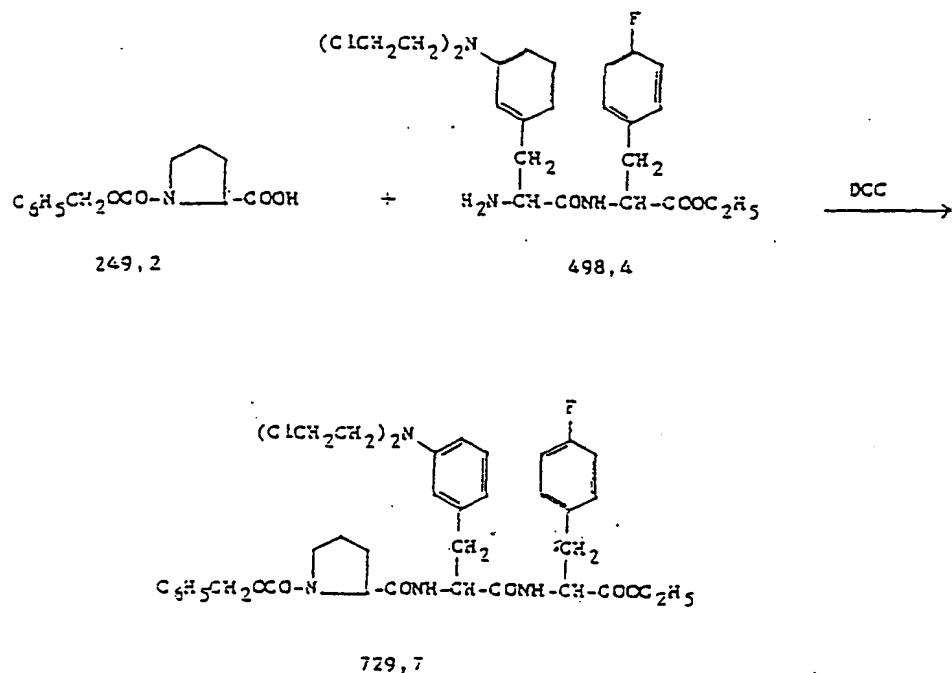
498,4

Unter Ausschluss der Luftfeuchtigkeit werden zu 390 g (0, 616 mol) die M-Carbobenzoxy-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin-ethylester unter langsamem Röhren 600 ml HBr in Eisessig (33 %) zugegeben. Die Auflösung und das Aufhören der CO<sub>2</sub>-Entwicklung findet nach 40 Minuten statt. Es wird 5 während weiteren 20 Minuten unter Röhren stehengelassen und mit ca. 400 ml Ether verdünnt. Man giesst das gesamte in 5 l Ether, welcher unter ständigem Röhren gehalten wird, dekantiert und wäscht das ausgefallene Oel 2 x mit 2 l Ether unter Dekantieren. Das Oel wird unter Röhren mit 4 l Wasser behandelt und man erhält einen Feststoff, welcher nach ca. 30 min. durch Filtration 10 gesammelt wird und vollständig mit insgesamt 1500 ml Wasser und 500 ml Ether gewaschen wird. Das so erhaltene Bromhydrat wird in 2 l Ethylacetat suspendiert und unter Röhren mit 450 ml gesättigter Natriumcarbonatlösung behandelt, derart bis die Lösung alkalisch ist. Nachdem die Auflösung 15 stattgefunden hat, filtriert man auf der Nutsche, um den suspendierten Dicylohexylharnstoff (sehr wenig) zu entfernen. In einem Scheidetrichter trennt man die organische Schicht von der wässrigen Phase ab, und die wässrige Phase wird mit weiteren 500 ml Ethylacetat extrahiert. Die gereinigten Extrakte werden mit 300 ml Wasser gewaschen, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> getrocknet und mit Norit 20 behandelt. Es wird filtriert und das Filtrat wird unter dem Vakuum getrocknet (40°C). Der Rückstand wird noch vor seiner Festigung in 500 bis 1000 ml Ether aufgenommen. Aus der erhaltenen Lösung wird während der Nacht ein weisses Produkt ausgefällt. Ausbeute: 247 g (80,4 %)

Smp. 100 -102 °C.

25  $\alpha_D^{20} = -7,5^\circ$  (c=2, Chloroform)  
TLC (BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 65:15:25; KMnO<sub>4</sub> verdünnt):  
Eine Bande, R<sub>f</sub> = 0,74  
Analyse für C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>  
N% = 8,34 (berechnet 8,43)  
Cl% = 14,1 (berechnet 14,2)

c) N-Carbobenzoxy-L-oroval-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalaninethyl ester



Eine Mischung von 249 g (0,5 mol) L-m-sarcolysyl-L-p-

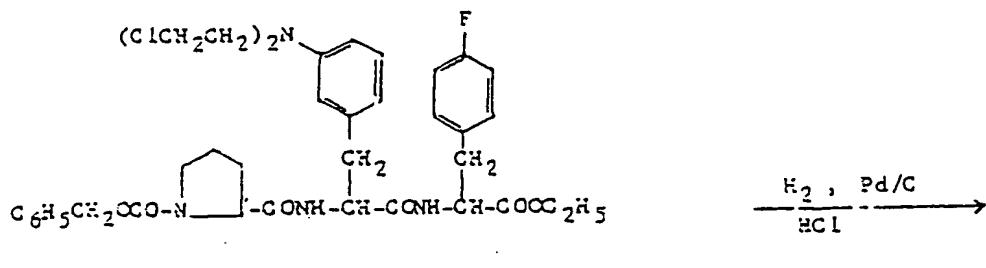
5 fluorphenylalaninethylester, 125 g (0,5 mol) N-Cbz-L-Prolin und 109 g (0,525 mol) DCC in 3000 ml Chloroform wird während 30 Minuten unter Rühren stehen gelassen, mit externer Kühlung während weiteren 90 Minuten bei Zimmertemperatur (TLC, Silikagel G, Chf/Me<sub>2</sub>CO 9:1; oder mit BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 65:15:25; KMnO<sub>4</sub>, verdünnt, sauer). Nach der Entfernung des 10 Dicyclohexylharnstoff durch Filtration wird das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft und der Rückstand wird noch in flüssigem Zustand in 800 ml Ether gegossen. Von der erhaltenen Lösung fällt langsam das Produkt aus, welches auf einem Filter gesammelt wird. Ausbeute 290 g (78,5%).

Smp. = 148-150°C,  $\alpha_D^{20} = -42,4^\circ$  (c=2; Chloroform)

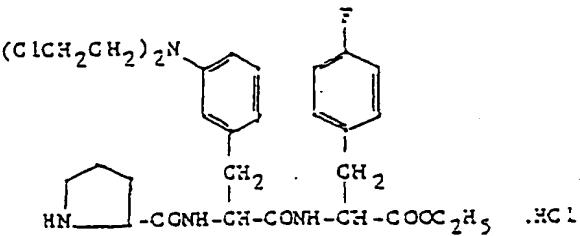
Analysen für  $C_{37}H_{43}FCl_2N_4O_6$   
 N% = 7,78% (berechnet 7,68)  
 Cl% = 9,6 (berechnet 9,7)

d) L-Prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin-ethylester-hydrochlorid

5



729,7



632

Eine Mischung von 157,5 (0,261 mol) N-Carbobenzoxy-L-prolyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorophenylalanin-ethylester und 30 g Palladium auf Kohlenstoff 5% wird suspendiert unter einem Stickstoffstrom in 15 ml Eisessig und 1750 ml

10 Methanol. Die Reaktionsmischung wird unter Rühren gehalten und wird unter einem Wasserstoffstrom reduziert. Nach der Beendigung der  $\text{CO}_2$ -Entwicklung (nach 4 - 5 Stunden) wird eine TLC-Chromatographiekontrolle durchgeführt (Kieselgel G), wobei mit Chloroform-Aceton 9:1 eluiert wird und mit verdünntem  $\text{KMnO}_4$  sichtbar gemacht wird.

Nachdem der Entfernung des Katalysators durch Filtration wird das Filtrat mit konzentrierter ethanolischer HCl in stöchiometrischer Menge oder wenig mehr angesäuert. Der weisse, kristalline Niederschlag, welcher sich langsam bildet, wird auf einem Filter gesammelt und mit Ethanol oder mit Ether gewaschen: 85 g. Das Filtrat wird praktisch bis zur Trockenheit konzentriert und der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert: 25 g. Vollständige Ausbeute: 110 g (80, 5%); Smp. 122 - 124 °C (Änderung des Aggregatzustandes)

10  $\alpha_D^{20} = 13,0^\circ \pm 0,5$  (c= 2; MeOH)

TLC (Kieselgel G; BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 65:15:25; KMnO<sub>4</sub> verdünnt: eine Bande R<sub>f</sub> = 0,54.

Analyse für C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>3</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

N % = 8,93% (berechnet 8,86)

Cl % = 16,7 % (berechnet 16,8)

Cl-% = 5,65% (berechnet 5,6)

15 Beispiel 1:

Parenterales Präparat zur Behandlung von Melanomen.

	Komponente	Menge
Peptid	PSF-ethylester · HCl	8 g
Cyclodextrin-Träger	Hydroxypropyl-β-cyclodextrin	16 g
andere Wirk- und Hilfsstoffe	Chlophenamin Wasser, steril	32 mg ad 100 ml

Darreichungsform: sterile Lösung in Ampulle

Dosiseinheit: 40 mg Peptid/0,5 ml Lösung,

80 mg Hydroxypropyl-β-cyclodextrin /0,5 ml Lösung,

1,6 mg Chlorphenamin /0,5 ml Lösung

Bemerkungen: zur i.v. Verabreichung oder für Infusionen bestimmt.

20 Beispiel 2:

Orales Zytostatikum in Kapsel

	Komponente	Menge (Dosiseinheit)
Peptid	PSF-ethylester · HCl	12 mg
Cyclodextrin-Träger	β-Cyclodextrin	25 g

## Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Krebsleiden enthaltend als aktive Komponente mindestens eine Peptidverbindung, welche verzögert freigesetzt wird, dadurch gekennzeichnet,  
5 dass die Peptidverbindung ausgewählt ist aus der Gruppe:

- L-Seryl-L-p-fluorphenylalanyl-L-m-sarcolysin
- L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin
- L-m-Sarcolysyl-N-nitro-L-arginyl-L-norvalin
- L-p-Fluorphenylalanyl-L-m-sarcolysil-L-asparagin
- 10 - L-p-Fluorphenylalanyl-glycyl-L-m-sarcolysyl-norvalin
- L-m-Sarcolysyl-L-arginyl-L-lysyl-L-m-sarcolysyl-L-histidin

und Niederalkylester und/oder Säureadditionssalze davon, und dass die Zusammensetzung mindestens ein gegebenenfalls substituiertes Cyclodextrin als Hilfs- oder Trägersubstanz enthält.

15 2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Niederalkylester Methyl- oder Ethylester sind

3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2 zur parenteralen Applikation, dadurch gekennzeichnet, dass das gegebenenfalls substituierte Cyclodextrin Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin ist.

20 4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 3 zur oralen Applikation, dadurch gekennzeichnet, dass das gegebenenfalls substituierte Cyclodextrin ausgewählt ist aus  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Cyclodextrin.

25 5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidverbindung L-Proyl-L-m-sarcolysyl-L-p-fluorphenylalanin ist, vorzugsweise in Form des Hydrochlorids des Ethylesters.

6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Mol-Verhältnis der Peptidverbindung zum gegebenenfalls substituierten Cyclodextrin 1:1 bis 1:10 und vorzugsweise 1:2 bis 1:4 beträgt.

5 7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich noch mindestens einen pharmakologisch aktiven Wirkstoff enthält.

8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der zusätzliche pharmakologisch aktive Wirkstoff Chlorphenamin ist.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No  
PCT/CH 98/00300

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K38/06 A61K38/07 A61K38/08 A61K47/48

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FR 2 101 226 A (ISTITUTO SIEROTERAPICO MILANESE "SERAFINO BELFANTI" ENTE MORALE) 31 March 1972 see claims 3-5,7 ----	1-5
Y	FR 2 094 175 A (ISTITUTO SIEROTERAPICO MILANESE "SERAFINO BELFANTI" ENTE MORALE) 4 February 1972 see page 15 ----	1
Y	WO 94 20136 A (DEPARTMENT OF THE ARMY, UNITED STATES GOVERNMENT) 15 September 1994 see claims 1,4 ----	1-5 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 October 1998

Date of mailing of the international search report

16/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alvarez Alvarez, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr al Application No  
PCT/CH 98/00300

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAJEWSKI ET AL.: "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 85, no. 11, November 1996, pages 1142-1168, XP000629515 -----	
A	ASTALDI : "Peptichemio: a multifaceted antiblastic drug" WADLEY MEDICAL BULLETIN, vol. 5, no. 3, 1975, pages 303-326, XP002079526 -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CH 98/00300

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR 2101226	A 31-03-1972	GB 1329869	A 12-09-1973	US 3814746 A 04-06-1974
FR 2094175	A 04-02-1972	DE 2128549	A 13-01-1972	
WO 9420136	A 15-09-1994	CA 2134753	A 15-09-1994	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internes Aktenzeichen  
PCT/CH 98/00300

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 A61K38/06 A61K38/07 A61K38/08 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	FR 2 101 226 A (ISTITUTO SIEROTERAPICO MILANESE "SERAFINO BELFANTI" ENTE MORALE) 31. März 1972 siehe Ansprüche 3-5,7 ---	1-5
Y	FR 2 094 175 A (ISTITUTO SIEROTERAPICO MILANESE "SERAFINO BELFANTI" ENTE MORALE) 4. Februar 1972 siehe Seite 15 ---	1
Y	WO 94 20136 A (DEPARTAMENT OF THE ARMY, UNITED STATES GOVERNMENT) 15. September 1994 siehe Ansprüche 1,4 ---	1-5 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :  
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  
 "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  
 "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  
 "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht  
 "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist  
 "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden  
 "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist  
 "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  5. Oktober 1998	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  16/10/1998
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Alvarez Alvarez, C

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/CH 98/00300

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	RAJEWSKI ET AL.: "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, Bd. 85, Nr. 11, November 1996, Seiten 1142-1168, XP000629515 -----	
A	ASTALDI : "Peptichemio: a multifaceted antiblastic drug" WADLEY MEDICAL BULLETIN, Bd. 5, Nr. 3, 1975, Seiten 303-326, XP002079526 -----	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen... die zur selben Patentfamilie gehören

Intern:    Ies Aktenzeichen

PCT/CH 98/00300

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
FR 2101226	A 31-03-1972	GB 1329869	A 12-09-1973	US 3814746 A 04-06-1974
FR 2094175	A 04-02-1972	DE 2128549	A 13-01-1972	
WO 9420136	A 15-09-1994	CA 2134753	A 15-09-1994	